

## BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



EP00109245

REC'D	27 OCT 2000
WIPO	PCT

4

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung**

**PRIORITY  
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

**Aktenzeichen:** 199 47 490.7

**Anmeldetag:** 1. Oktober 1999

**Anmelder/Inhaber:** BASF AG, Ludwigshafen/DE

**Bezeichnung:** GMP-Synthetase aus Pflanzen

**IPC:** C 07 H, C 12 N, C 12 Q

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 21. August 2000  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

*Waasmaier*

Waasmaier

## Patentansprüche

1. DNA-Sequenz, enthaltend die Kodierregion einer pflanzlichen GMP-Synthetase, dadurch gekennzeichnet, daß diese DNA-Sequenz die Nukleotidabfolge SEQ-ID No: 1 oder SEQ-ID No: 3 aufweist.
- 5 2. DNA-Sequenzen, die mit der DNA-Sequenz SEQ-ID NO: 1 oder SEQ-ID No: 3 gemäß Anspruch 1 oder Teilen davon oder Derivaten, die durch Insertion, Deletion oder Substitution von diesen Sequenzen abgeleitet sind, hybridisieren und für ein Protein kodieren, das die biologische Aktivität einer GMP-Synthetase besitzt.
- 10 15 3. Protein mit GMP-Synthetase-Aktivität, enthaltend eine Aminosäuresequenz, die eine Teilsequenz von mindestens 100 Aminosäuren aus SEQ-ID NO: 2 oder 4 darstellt.
- 15 4. Protein nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß es als Aminosäuresequenz die Teilsequenz 50 - 300 aus SEQ-ID NO: 2 oder SEQ-ID No: 4 enthält.
- 20 5. Protein nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß es als Aminosäuresequenz die in SEQ-ID NO: 2 oder SEQ-ID No: 4 dargestellte Sequenz enthält.
- 25 6. Verwendung einer DNA-Sequenz nach Anspruch 1 oder 2 zur Einführung in pro- oder eukaryontische Zellen, wobei diese Sequenz gegebenenfalls mit Steuerelementen, die die Transkription und Translation in den Zellen gewährleisten, verknüpft ist und zur Expression einer translatierbaren mRNA, die die Synthese einer pflanzlichen GMP-Synthetase bewirkt, führt.
- 30 7. Verwendung einer DNA-Sequenz nach Anspruch 1 oder 2 zur Herstellung eines Testsystems zur Identifizierung von Inhibitoren der pflanzlichen GMP-Synthetase mit herbizider Wirkung.
- 35 8. Testsystem basierend auf der Expression einer DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 nach Anspruch 1 oder 2 zur Identifizierung von Inhibitoren der pflanzlichen GMP-Synthetase mit herbizider Wirkung.

2

9. Pflanze mit modifiziertem Gehalt an Guanosinnukleotiden hergestellt nach Expression einer DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder 3 nach Anspruch 1 oder 2 in Sense- oder Antisense-Orientierung.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

K

## GMP-Synthetase aus Pflanzen

## Beschreibung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft die Identifizierung pflanzlicher GMP-Synthetase (Guanosinmonophosphat-Synthetase) als neues Ziel für herbizide Wirkstoffe. Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin DNA-Sequenzen kodierend für ein Polypeptid mit GMP-

10 Synthetase (EC 6.3.5.2)- Aktivität. Zudem betrifft die Erfindung die Verwendung einer Nukleinsäure kodierend für ein Protein mit GMP-Synthetase-Aktivität pflanzlichen Ursprungs zur Herstellung eines Testsystems zur Identifizierung von Inhibitoren der GMP-Synthetase mit herbizider Wirkung. Weiterhin betrifft die Erfindung die Verwendung der Nukleinsäure kodierend für pflanzliche GMP-Synthetase zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhter Resistenz gegenüber Inhibitoren der GMP-Synthetase, sowie zur Herstellung von Pflanzen mit modifiziertem Gehalt an Guanosinnukleotiden.

20

Pflanzen sind in der Lage, aus Kohlendioxid, Wasser und anorganischen Salzen ihre Zellkomponenten zu synthetisieren.

Dieser Prozeß ist nur möglich, indem biochemische Reaktionen zum 25 Aufbau organischer Substanzen genutzt werden. Pflanzen müssen die Nukleotide als Bestandteile der Nukleinsäuren *de novo* synthetisieren.

Nukleotide müssen als Bestandteile der Nukleinsäuren DNA und RNA 30 insbesondere in schnell wachsenden Geweben der Pflanzen über mehrstufige Stoffwechselwege synthetisiert werden. Nukleotide sind ferner in nahezu alle Stoffwechselwegen eingebunden. Nucleosidtriphosphate, vor allem ATP, treiben viele energieaufwändige Reaktionen der Zelle. Adeninnukleotide tauchen darüber hinaus 35 auch als Komponente in essentiellen Coenzymen wie Coenzym A sowie Nicotinamid- und Flavin-Coenzymen auf, die an vielen zellulären Umsetzungen beteiligt sind. Guanosinnukleotide geben diversen zellulären Prozessen, wie Proteintranslation, Microtubuli-Assemblierung, vesikulärem Transport, Signaltransduktion und Zellteilung 40 eine Reaktionsrichtung. Ferner stellen Nukleotide die Ausgangsmetabolite zur Biosynthese von Methylxanthinen, wie Coffein und Theobromin insbesondere in Pflanzenfamilien der Rubiaceae und Theaceae dar.

45 Purinnukleotide werden in Mikroorganismen, Tieren und Pflanzen *de novo* auf gleiche Weise ausgehend von Phosphoribosylpyrophosphat (PRPP) gebildet. In einer 10-stufigen Reaktionsfolge wird IMP

synthetisiert. IMP kann in Folgereaktionen durch Adenylosuccinat-Synthetase und Adenylosuccinat-Lyase zum AMP umgesetzt werden. Zur Synthese von GMP wird IMP zunächst durch die IMP-Dehydrogenase zum XMP umgesetzt, welches durch die GMP-Synthetase zum GMP 5 aminiert wird, siehe Abb. 1.

Gene, die für GMP-Synthetase kodieren, wurden aus verschiedenen Organismen isoliert.

10 Die Kompartimentierung des Purinbiosynthesewegs in Pflanzen wurde bisher nur wenig untersucht. Der in den Wurzelknöllchen der Leguminosen in Form von Glutamin und Aspartat fixierte Stickstoff wird über den de novo Syntheseweg zunächst in Purine überführt. In den Wurzelknöllchen von *Glycine max* und *Vigna unguiculata* L., 15 ist dieser Weg in den Plastiden lokalisiert (Boland and Schubert, Arch. Biochem. Biophys. 220 (1983), 179-187; Shelp et al., Arch. Biochem. Biophys. 224 (1983), 429-441). Neueren Untersuchungen zufolge sind Enzymaktivitäten des Purinbiosynthesewegs in den Wurzelknöllchen von *Vigna unguiculata* zudem jedoch auch in Mito- 20 chondrien zu finden (Atkins et al., Plant Physiology 113 (1997), 127-135; Smith et al., Plant Molecular Biology 36 (1998), 811-820).

Die Regulation dieses Synthesewegs wurde bislang nur in Mikroorganismen und Tieren untersucht und umfaßt Transkriptionskontrolle, Endproduktinhibierung und allosterische Regulation. Eine Schlüsselstellung im tierischen, als auch pflanzlichen System wird dem Enzym PRPP-Amidotransferase (PRPP-ATase) des zweiten Reaktionsschritts zugeschrieben, welches durch die Endprodukte IMP, 30 AMP und GMP allosterisch reguliert wird (Reynolds et al., Archives of Biochemistry and Biophysics 229 (1984), 623-631).

Die GMP-Synthetase spielt auch hinsichtlich einer balancierten Synthese von Guanosinnukleotiden und Adenosinnukleotiden eine 35 Rolle, da ATP ein Substrat der GMP-Synthetase ist.

Da Pflanzen auf einen funktionierenden Nukleotidstoffwechsel angewiesen sind, bietet sich dieser Stoffwechsel als mögliches Ziel für neue Herbizide an. Tatsächlich wurden bereits Wirkstoffe beschrieben, die inhibierend auf Enzyme der de novo Purinbiosynthese wirken. Beispielhaft ist 5'-Phosphohydranthocidin zu nennen, welches ein Enzym des pflanzlichen Purin-Stoffwechsels, die Adenylosuccinat-Synthetase (ASS), inhibiert (Siehl et al., Plant Physiol. 110 (1996), 753-758). Ferner existieren Inhibitoren für 40 Enzyme dieses Stoffwechselweges aus Tieren und Mikroorganismen. Folat-Analoga inhibieren diverse Folat-abhängige Reaktionen, unter anderem das Enzym GAR-Transformylase und wirken antiproli- 45

ferativ, antiinflammatorisch und immunosuppressiv. Mycophenolat (MPA) wirkt als Hemmstoff der IMP-Dehydrogenase antimikrobiell, antiviral und immunosuppressiv (Kitchin et al., Journal of the American Academy of Dermatology 37 (1997), 445-449).

5

Der Nachweis der Eignung eines Enzyms als Herbizid-Target kann zum Beispiel durch Verringerung der Enzymaktivität mittels der Antisensetechnik in transgenen Pflanzen gezeigt werden. Wird auf diese Weise ein verringertes Wachstum bewirkt, so läßt sich damit 10 auf eine Eignung des in seiner Aktivität reduzierten Enzyms als Wirkort für herbizide Wirkstoffe schließen. Beispielsweise wurde dies für die Acetolactat-Synthase an transgenen Kartoffelpflanzen gezeigt (Höfgen et al., Plant Physiology 107 (1995), 469-477).

15 Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es zu belegen, daß GMP-Synthetase in Pflanzen ein geeignetes herbizides Target ist, die Isolierung einer vollständigen pflanzlichen cDNA kodierend für das Enzym GMP-Synthetase und deren funktionelle Expression in bakteriellen oder eukaryontischen Zellen, sowie die Herstellung 20 eines effizienten und einfachen GMP-Synthetase Testsystems für die Durchführung von Inhibitor-Enzym-Bindungsstudien.

Die Aufgabe wurde gelöst durch Isolierung eines für das pflanzliche Enzym GMP-Synthetase kodierenden Gens, der Herstellung von 25 Antisensekonstrukten der GMP-Synthetase, sowie der funktionellen Expression der GMP-Synthetase in bakteriellen oder eukaryontischen Zellen.

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft die Isolierung 30 einer Vollängen-cDNA codierend für eine funktionelle Glutamin-hydrolysierende GMP-Synthetase (EC 6.3.5.2.) aus Tabak (*Nicotiana tabacum*).

Ein erster Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine DNA-Sequenz SEQ-ID NO:1 enthaltend die Kodierregion einer pflanzlichen 35 GMP-Synthetase aus Tabak, siehe Beispiel 1.

Ein anderer Gegenstand der Erfindung ist eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 3 enthaltend einen Teil der Kodierregion einer pflanzlichen 40 GMP-Synthetase aus *Physcomitrella patens*, siehe Beispiel 2.

Weiterer Gegenstand der Erfindung sind DNA-Sequenzen, die von SEQ-ID NO: 1 oder SEQ-ID No: 3 abgeleitet sind oder mit einer dieser Sequenzen hybridisieren und die für ein Protein kodieren, 45 das die biologische Aktivität einer GMP-Synthetase besitzt.

Tabakpflanzen der Linie Nicotiana tabacum cv. Samsun NN, die ein Antisensekonstrukt der GMP-Synthetase tragen, wurden näher charakterisiert. Die Pflanzen zeigen in unterschiedlichem Maße eine Wachstumsretardierung. Die transgenen Linien sowie die Nachkommen 5 als 1. und 2. Generation wiesen ein verringertes Wachstum in Erde auf. In Pflanzen mit verringertem Wachstum konnte eine im Vergleich zum Wildtyp reduzierte GMP-7M RNA-Menge in der Northern-Hybridisierung detektiert werden. Ferner konnte im Western-blot Experiment eine im Vergleich mit Wildtyppflanzen verringerte 10 Menge der GMP-Synthetase in den transgenen Linien detektiert werden, siehe Beispiel 7. Es lässt sich eine Korellation zwischen Wachstumsretardierung und Reduktion der GMP-Synthetase Proteinmenge feststellen. Dieser klare Zusammenhang weist GMP-Synthetase 15 erstmals eindeutig als geeignetes Zielprotein für herbizide Wirkstoffe aus.

Um effiziente Hemmstoffe der pflanzlichen GMP-Synthetase finden zu können, ist es notwendig, geeignete Testsysteme, mit denen Inhibitor-Enzym-Bindungsstudien durchgeführt werden können, zur 20 Verfügung zu stellen. Hierzu wird beispielsweise die komplette cDNA-Sequenz der GMP-Synthetase aus Tabak in einen Expressionsvektor (pQE, Qiagen) kloniert und in E. coli überexprimiert, siehe Beispiel 4.

25 Alternativ kann jedoch die Expressionskassette enthaltend eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 beispielsweise in anderen Bakterien, in Hefen, Pilzen, Algen, Pflanzenzellen, Insektenzellen oder Säugetierzellen exprimiert werden, siehe Beispiel 5.

30 Das mit Hilfe der erfindungsgemäßen Expressionskassette exprimierte GMP-Synthetase-Protein eignet sich besonders zur Auffindung von für die GMP-Synthetase spezifischen Hemmstoffen.

Dazu kann die pflanzliche GMP-Synthetase beispielsweise in einem 35 Enzymtest eingesetzt werden, bei dem die Aktivität der GMP-Synthetase in An- und Abwesenheit des zu testenden Wirkstoffs ermittelt wird. Aus dem Vergleich der beiden Aktivitätsbestimmungen lässt sich eine qualitative und quantitative Aussage über das Hemmverhalten des zu testenden Wirkstoffes machen, siehe Beispiel 8.

Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Testsystems kann eine Vielzahl von chemischen Verbindungen schnell und einfach auf herbizide Eigenschaften überprüft werden. Das Verfahren gestattet es, reproduzierbar aus einer großen Anzahl von Substanzen gezielt solche mit großer Wirkstärke auszuwählen, um mit diesen Substanzen an-

schließend weitere, dem Fachmann geläufige vertiefte Prüfungen durchzuführen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Verbindungen mit 5 herbizider Wirkung, die mit dem oben beschriebenen Testsystem identifizierbar sind.

Inhibitoren der GMP-Synthetase mit herbizider Wirkung können als Defoliants, Desiccants, Krautabtötungsmittel und insbesondere als 10 Unkrautvernichtungsmittel verwendet werden. Unter Unkraut im weitesten Sinne sind alle Pflanzen zu verstehen, die an Orten aufwachsen, an denen sie unerwünscht sind. Ob die mit Hilfe des erfindungsgemäßen Testsystems gefundenen Wirkstoffe als totale oder selektive Herbizide wirken, hängt unter anderem von der an- 15 gewandten Menge ab.

Inhibitoren der GMP-Synthetase mit herbizider Wirkung können beispielsweise gegen folgende Unkräuter verwendet werden:

20 Dikotyle Unkräuter der Gattungen:

Sinapis, Lepidium, Galium, Stellaria, Matricaria, Anthemis, Galinsoga, Chenopodium, Urtica, Senecio, Amaranthus, Portulaca, Xanthium, Convolvulus, Ipomoea, Polygonum, Sesbania, Ambrosia, Cirsium, Carduus, Sonchus, Solanum, Rorippa, Rotala, Lindernia, 25 Lamium, Veronica, Abutilon, Emex, Datura, Viola, Galeopsis, Papaver, Centaurea, Trifolium, Ranunculus, Taraxacum.

Monokotyle Unkräuter der Gattungen:

Echinochloa, Setaria, Panicum, Digitaria, Phleum, Poa, Festuca, 30 Eleusine, Brachiaria, Lolium, Bromus, Avena, Cyperus, Sorghum, Agropyron, Cynodon, Monochoria, Fimbristylis, Sagittaria, Eleocharis, Scirpus, Paspalum, Ischaemum, Sphenoclea, Dactyloctenium, Agrostis, Alopecurus, Apera.

35 Gegenstand der Erfindung sind auch Expressionskassetten, deren Sequenz für eine GMP-Synthetase aus Tabak oder deren funktionelles Äquivalent kodieren. Die Nukleinsäuresequenz kann dabei z.B. eine DNA- oder eine cDNA-Sequenz sein.

40 Gegenstand der Erfindung ist auch eine Expressionskassette enthaltend eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 3 kodierend für einen Teil der pflanzlichen GMP-Synthetase aus *Physcomitrella patens*.

Die erfindungsgemäßen Expressionskassetten beinhalten außerdem 45 regulative Nukleinsäuresequenzen, welche die Expression der kodierenden Sequenz in der Wirtszelle steuern. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt eine erfindungsgemäße Expressions-

kassette stromaufwärts, d.h. am 5'-Ende der kodierenden Sequenz, einen Promotor und stromabwärts, d.h. am 3'-Ende, ein Polyadenylierungssignal und gegebenenfalls weitere regulatorische Elemente, welche mit der dazwischenliegenden kodierenden Sequenz für 5 das GMP-Synthetase-Gen operativ verknüpft sind. Unter einer operativen Verknüpfung versteht man die sequenzielle Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und ggf. weiterer regulativer Elemente derart, daß jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungs- 10 gemäß erfüllen kann.

Die Herstellung einer erfindungsgemäßen Expressionskassette erfolgt durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer geeigneten GMP-Synthetase-DNA Sequenz und einem Polyadenylierungssignal 15 nach gängigen Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold 20 Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987) beschrieben sind.

25 Gegenstand der Erfindung sind auch funktionell äquivalente DNA-Sequenzen, die für ein GMP-Synthetase-Gen kodieren und die bezogen auf die Gesamtlänge der DNA-Sequenz eine Sequenzhomologie mit der DNA-Sequenz SEQ-ID NO: 1 oder SEQ-ID No. 3 von 40 bis 100 % aufweisen.

30 Bevorzugter Gegenstand der Erfindung sind funktionell äquivalente DNA-Sequenzen, die für ein GMP-Synthetase-Gen kodieren und die bezogen auf die Gesamtlänge der DNA-Sequenz eine Sequenzhomologie mit der DNA-Sequenz SEQ-ID NO: 1 oder SEQ-ID No. 3 von 60 bis 100 35 % aufweisen.

Besonders bevorzugter Gegenstand der Erfindung sind funktionell äquivalente DNA-Sequenzen, die für ein GMP-Synthetase-Gen kodieren und die bezogen auf die Gesamtlänge der DNA-Sequenz eine Sequenzhomologie mit der DNA-Sequenz SEQ-ID NO: 1 oder SEQ-ID No. 3 von 80 bis 100 % aufweisen.

Funktionell äquivalente Sequenzen, die für ein GMP-Synthetase-Gen kodieren, sind erfindungsgemäß solche Sequenzen, welche trotz abweichender Nukleotidsequenz noch die gewünschten Funktionen besitzen. Funktionelle Äquivalente umfassen somit natürlich vorkommende Varianten der hierin beschriebenen Sequenzen sowie künstlich-

che, z.B. durch chemische Synthese erhaltene, an den Kodon-Gebräuch einer Pflanze angepaßte, künstliche Nukleotid-Sequenzen.

Unter einem funktionellen Äquivalent versteht man insbesondere 5 auch natürliche oder künstliche Mutationen einer ursprünglich isolierten für eine GMP-Synthetase kodierende Sequenz, welche weiterhin die gewünschte Funktion zeigt. Mutationen umfassen Substitutionen, Additionen, Deletionen, Vertauschungen oder Insertionen eines oder mehrerer Nukleotidreste. Somit werden 10 beispielsweise auch solche Nukleotidsequenzen durch die vorliegende Erfindung mit umfaßt, welche man durch Modifikation dieser Nukleotidsequenz erhält. Ziel einer solchen Modifikation kann z.B. die weitere Eingrenzung der darin enthaltenen kodierenden Sequenz oder z.B. auch die Einfügung weiterer Restriktionsenzyme 15 Schnittstellen sein.

Funktionelle Äquivalente sind auch solche Varianten, deren Funktion, verglichen mit dem Ausgangsgen bzw. Genfragment, abgeschwächt oder verstärkt ist.

20 Die erfindungsgemäße Expressionskassette kann darüberhinaus auch zur Transformation von Bakterien, Cyanobakterien, Hefen, filamentösen Pilzen und Algen mit dem Ziel der Herstellung von ausreichenden Mengen des Enzyms GMP-Synthetase eingesetzt werden.

25 Weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Protein aus Tabak gekennzeichnet durch die Aminosäuresequenz SEQ-ID NO: 2 bzw. Derivate oder Teile dieses Proteins mit GMP-Synthetase Aktivität.

30 Gegenstand der Erfindung sind auch pflanzliche Proteine mit GMP-Synthetase Aktivität mit einer Aminosäuresequenzhomologie zu der Tabak GMP-Synthetase von 20 - 100 % Identität.

Bevorzugt sind pflanzliche Proteine mit GMP-Synthetase Aktivität 35 mit einer Aminosäuresequenzhomologie zu der Tabak GMP-Synthetase von 50 - 100 % Identität.

Besonders bevorzugt sind pflanzliche Proteine mit GMP-Synthetase Aktivität mit einer Aminosäuresequenzhomologie zu der Tabak GMP-Synthetase von 80 - 100 % Identität.

Gegenstand der Erfindung sind auch pflanzliche Proteine mit GMP-Synthetase Aktivität mit einer Aminosäuresequenzhomologie zu der Physcomitrella patens GMP-Synthetase von 20 - 100 % Identität.

45

Bevorzugt sind pflanzliche Proteine mit GMP-Synthetase Aktivität mit einer Aminosäuresequenzhomologie zu der *Physcomitrella patens* GMP-Synthetase von 50 - 100 % Identität.

5 Besonders bevorzugt sind pflanzliche Proteine mit GMP-Synthetase Aktivität mit einer Aminosäuresequenzhomologie zu der *Physcomitrella patens* GMP-Synthetase von 80 - 100 % Identität.

Weitere Aufgabe der Erfindung war die Überexpression des GMP-  
10 Synthetase Gens in Pflanzen zur Herstellung von Pflanzen, die tolerant gegenüber Inhibitoren der GMP-Synthetase sind.

Durch Überexpression der für eine GMP-Synthetase kodierenden Gen-  
sequenz SEQ-ID NO: 1 in einer Pflanze wird eine erhöhte Resistenz  
15 gegenüber Inhibitoren der GMP-Synthetase erreicht. Die derart hergestellten transgenen Pflanzen sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

Die Wirksamkeit der Expression des transgen exprimierten GMP-  
20 Synthetase-Gens kann beispielsweise *in vitro* durch Sproßmeristemvermehrung oder durch einen Keimungstest ermittelt werden. Zudem kann eine in Art und Höhe veränderte Expression des GMP-Synthetase-Gens und deren Auswirkung auf die Resistenz gegenüber Hemmstoffen der GMP-Synthetase an Testpflanzen in Gewächshaus-  
25 versuchen getestet werden.

Gegenstand der Erfindung sind außerdem transgene Pflanzen, transformiert mit einer erfindungsgemäßen Expressionskassette, enthaltend die DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1, die durch zusätzliche Expression der DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 tolerant gegenüber Inhibitoren der GMP-Synthetase geworden sind, sowie transgene Zellen, Gewebe, Teile und Vermehrungsgut solcher Pflanzen. Besonders bevorzugt sind dabei transgene Kulturpflanzen, wie z.B. Gerste, Weizen, Roggen, Mais, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Hanf, Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Alfalfa, Salat und die verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspezies, sowie Leguminosen.

Eine Veränderung des Nukleotidgehaltes in Pflanzen kann in verschiedenen Fällen von Nutzen sein. Säuglingsnahrungsprodukten auf pflanzlicher Basis werden beispielsweise Nukleotide zugesetzt, um eine der Muttermilch entsprechende Nährstoffzusammensetzung zu erreichen. Weiterhin wäre ein optimierter Nukleotidgehalt im Falle der enteralen Ernährung von Patienten sinnvoll. Ein reduzierter Purin-Nukleotidgehalt in ernährungsrelevanten Pflanzen ist für die diätetische Ernährung Gicht-kranker Patienten relevant. Nukleotide wirken ferner geschmacksbildend und geschmacks-

verstärkend, so daß sich ein veränderter Nukleotidgehalt auf geschmackliche Eigenschaften von Pflanzen auswirkt.

Weiterer Gegenstand der Erfindung sind daher Pflanzen, die nach 5 Expression der DNA-Sequenz SEQ-ID NO: 1 oder SEQ-ID No: 3 in der Pflanze einen modifizierten Gehalt an Guanosinnukleotiden aufweisen.

Eine Pflanze mit modifiziertem Gehalt an Guanosinnukleotiden wird 10 beispielsweise durch Expression einer zusätzlichen DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder 3 in sense- oder antisense-Orientierung in der Pflanze hergestellt. Modifizierter Gehalt an Guanosinnukleotiden bedeutet, daß sowohl Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Guanosinnukleotiden bei sense-Orientierung als auch Pflanzen mit erniedrigtem Gehalt an Guanosinnukleotiden bei sense-Orientierung (Cosuppression) oder antisense-Orientierung hergestellt werden können.

Erhöhung des Gehaltes an Guanosinnukleotiden bedeutet beispielsweise im Rahmen der vorliegenden Erfindung die künstlich erworbene Fähigkeit einer erhöhten Biosyntheseleistung für Guanosinnukleotide durch funktionelle Überexpression des GMP-Synthetase-Gens in der Pflanze gegenüber der nicht gentechnisch modifizierten Pflanze für die Dauer mindestens einer Pflanzengeneration.

25 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung pflanzlicher GMP-Synthetasen zur Veränderung der Konzentrationen von Methylxanthinen in Pflanzen.

30 Insbesondere bevorzugt sind Sequenzen, die ein Targeting in den Apoplasten, in Plastiden, die Vakuole, das Mitochondrium, das Endoplasmatische Retikulum (ER) oder durch ein Fehlen entsprechender operativer Sequenzen einen Verbleib im Kompartiment des Entstehens, dem Zytosol, gewährleisten (Kermode, Crit. Rev. Plant 35 Sci. 15, 4 (1996), 285-423).

Beispielhaft kann die pflanzliche Expressionskassette in den Tabak-Transformationsvektor pBinAR eingebaut werden, siehe Beispiel 6.

40 Als Promotoren der erfindungsgemäßen Expressionskassette ist grundsätzlich jeder Promotor geeignet, der die Expression von Fremdgenen in Pflanzen steuern kann. Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der 45 einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt ist der CaMV 35S-Promotor aus dem Blumenkohl-Mosaik-Virus (Franck et al., Cell 21(1980), 285-294). Dieser Promotor enthält unterschiedliche

10

Erkennungssequenzen für transkriptionale Effektoren, die in ihrer Gesamtheit zu einer permanenten und konstitutiven Expression des eingeführten Gens führen (Benfey et al., EMBO J. 8 (1989), 2195-2202).

5

Die erfindungsgemäße Expressionskassette kann auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten, durch den die Expression des exogenen GMP-Synthetase-Gens in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige Promotoren wie z.B.

10 der PRP1-Promotor (Ward et al., Plant. Mol. Biol. (1993) 22, 361-366), ein durch Salizylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein durch Benzenesulfonamid-induzierbarer (EP 388186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer (Gatz et al., Plant J. (1992) 2, 397-404), ein durch Abscisinsäure-induzierbarer (EP0335528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer (WO 93/21334) Promotor sind in der Literatur beschrieben und können u.a. verwendet werden.

Weiterhin sind insbesonders solche Promotoren bevorzugt, die die Expression in Geweben oder Pflanzenteilen sicherstellen, in denen die Biosynthese von Purinen bzw. dessen Vorstufen stattfindet. Insbesondere zu nennen sind Promotoren, die eine blattspezifische Expression gewährleisten. Zu nennen sind der Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel oder der ST-LSI Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al., EMBO J., (1989) 8, 2445-245).

Mit Hilfe eines samenspezifischen Promotors kann ein Fremdprotein stabil bis zu einem Anteil von 0,67% des gesamten löslichen Samenproteins in den Samen transgener Tabakpflanzen exprimiert werden (Fiedler und Conrad, Bio/Technology (1995) 10, 1090-1094). Die erfindungsgemäße Expressionskassette kann daher beispielsweise einen samenspezifischen Promotor (bevorzugt den Phaseolin-Promotor, den USP- oder LEB4-Promotor), das LEB4-Signalpeptid, das zu exprimierende Gen und ein ER-Retentionssignal enthalten.

35

Die inserierte Nukleotid-Sequenz kodierend für eine GMP-Synthetase kann synthetisch hergestellt oder natürlich gewonnen sein oder eine Mischung aus synthetischen und natürlichen DNA-Be standteilen enthalten. Im allgemeinen werden synthetische Nukleotid-Sequenzen mit Kodons erzeugt, die von Pflanzen bevorzugt werden. Diese von Pflanzen bevorzugten Kodons können aus Kodons mit der höchsten Proteinhäufigkeit bestimmt werden, die in den meisten interessanten Pflanzenspezies exprimiert werden. Bei der Präparation einer Expressionskassette können verschiedene DNA-Fragmente manipuliert werden, um eine Nukleotid-Sequenz zu erhalten, die zweckmäßigerweise in der korrekten Richtung liest und die mit einem korrekten Leseraster ausgestattet ist. Für die Ver-

bindung der DNA-Fragmente miteinander können an die Fragmente Adaptoren oder Linker angesetzt werden.

Außerdem sind artifizielle DNA-Sequenzen geeignet, solange sie,  
5 wie oben beispielsweise beschrieben, die gewünschte Eigenschaft der Erhöhung des Gehaltes an Guanosinnukleotiden in der Pflanze durch Überexpression des GMP-Synthetase-Gens in Kulturpflanzen vermitteln. Solche artifiziellen DNA-Sequenzen können beispielsweise durch Rückübersetzung mittels Molecular Modelling kon-  
10 struierter Proteine, die GMP-Synthetase-Aktivität aufweisen oder durch *in vitro*-Selektion ermittelt werden. Besonders geeignet sind kodierende DNA-Sequenzen, die durch Rückübersetzung einer Polypeptidsequenz gemäß der für die Wirtspflanze spezifischen Kodon-Nutzung erhalten wurden. Die spezifische Kodon-Nutzung kann  
15 ein mit pflanzengetischen Methoden vertrauter Fachmann durch Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der zu transformierenden Pflanze leicht ermitteln.

Als weitere erfindungsgemäße geeignete äquivalente Nukleinsäure-  
20 Sequenzen sind zu nennen Sequenzen, welche für Fusionsproteine kodieren, wobei Bestandteil des Fusionsproteins ein pflanzliches GMP-Synthetase-Polypeptid oder ein funktionell äquivalenter Teil davon ist. Der zweite Teil des Fusionsproteins kann z.B. ein weiteres Polypeptid mit enzymatischer Aktivität sein oder eine anti-  
25 gene Polypeptidsequenz mit deren Hilfe ein Nachweis auf GMP-Synthetase-Expression möglich ist (z.B. myc-tag oder his-tag). Bevorzugt handelt es sich dabei jedoch um eine regulative Proteinquenz, wie z.B. ein Signal- oder Transitpeptid, das das GMP-Synthetase-Protein an den gewünschten Wirkort leitet.

30 Zweckmäßigerweise sollten die erfindungsgemäßen Promotor- und die Terminator-Regionen in Transkriptionsrichtung mit einem Linker oder Polylinker, der eine oder mehrere Restriktionsstellen für die Insertion dieser Sequenz enthält, versehen werden. In der Re-  
35 gel hat der Linker 1 bis 10, meistens 1 bis 8, vorzugsweise 2 bis 6 Restriktionsstellen. Im allgemeinen hat der Linker innerhalb der regulatorischen Bereiche eine Größe von weniger als 100 bp, häufig weniger als 60 bp, mindestens jedoch 5 bp. Der erfindungsgemäße Promotor kann sowohl nativ bzw. homolog als auch fremdar-  
40 tig bzw. heterolog zur Wirtspflanze sein. Die erfindungsgemäße Expressionskassette beinhaltet in der 5'-3'-Transkriptionsrichtung den erfindungsgemäßen Promotor, eine beliebige Sequenz und eine Region für die transkriptionale Termination. Verschiedene Terminationsbereiche sind gegeneinander beliebig austauschbar.

## 12

Ferner können Manipulationen, die passende Restriktionsschnittstellen bereitstellen oder die überflüssige DNA oder Restriktionsschnittstellen entfernen, eingesetzt werden. Wo Insertionen, Deletionen oder Substitutionen wie z.B. Transitionen und Transversionen in Frage kommen, können in vitro-Mutagenese, "primer repair", Restriktion oder Ligation verwendet werden. Bei geeigneten Manipulationen, wie z.B. Restriktion, "chewing-back" oder Auffüllen von Überhängen für "bluntends", können komplementäre Enden der Fragmente für die Ligation zur Verfügung gestellt werden.

10

Bevorzugte Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA-Polyadenylierungssignale aus *Agrobacterium tumefaciens*, insbesondere des Gens 3 der T-DNA (Octopin Synthase) des Ti-Plasmids pTiACH5 entsprechen (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984) 835 ff) oder funktionelle Äquivalente.

Zur Transformation einer Wirtspflanze mit einer für eine GMP-Synthetase kodierenden DNA wird eine erfindungsgemäße Expressionskassette als Insertion in einen rekombinanten Vektor eingebaut, dessen Vektor-DNA zusätzliche funktionelle Regulationssignale, beispielsweise Sequenzen für Replikation oder Integration enthält. Geeignete Vektoren sind unter anderem in "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (CRC Press), Kap. 6/7, S. 71-119 beschrieben.

Die Übertragung von Fremdgenen in das Genom einer Pflanze wird als Transformation bezeichnet. Es werden dabei die beschriebenen Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengeweben oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt. Geeignete Methoden sind die Protoplastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, der biolistische Ansatz mit der Genkanone, die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, die Mikroinjektion und der durch *Agrobacterium* vermittelte Gentransfer. Die genannten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press (1993) 128-143 sowie in Potrykus Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991) 205-225) beschrieben. Vorzugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor kloniert, der geeignet ist, *Agrobacterium tumefaciens* zu transformieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984) 8711).

45

13

Mit einer erfindungsgemäßen Expressionskassette transformierte Agrobakterien können ebenfalls in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen, wie Getreide, Mais, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, 5 Flachs, Hanf, Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Alfalfa, Salat und den verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspezies sowie Leguminosen verwendet werden, z.B. indem verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

10

Der Biosytheseort von Pyrimidinen ist im allgemeinen das Blattgewebe, so daß eine blattspezifische Expression des GMP-Synthetase-Gens sinnvoll ist. Es ist jedoch naheliegend, daß die Pyrimidin-Biosynthese nicht auf das Blattgewebe beschränkt sein muß, sondern auch in allen übrigen Teilen der Pflanze beispielsweise in fetthaltigen Samen - gewebespezifisch erfolgen kann. 15

Darüberhinaus ist eine konstitutive Expression des exogenen GMP-Synthetase-Gens von Vorteil. Andererseits kann aber auch eine induzierbare Expression wünschenswert erscheinen. 20

Unter Verwendung der oben zitierten Rekombinations- und Klonierungstechniken können die erfindungsgemäßen Expressionsketten in geeignete Vektoren kloniert werden, die ihre Vermehrung, beispielsweise in E. coli, ermöglichen. Geeignete Klonierungsvektoren sind u.a. pBR322, pUC-Serien, M13mp-Serien und pACYC184. Besonders geeignet sind binäre Vektoren, die sowohl in E. coli als auch in Agrobakterien replizieren können. 25

30 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung einer erfindungsgemäßen Expressionskassette zur Transformation von Pflanzen, Pflanzenzellen, -geweben oder Pflanzenteilen. Vorzugsweise ist Ziel der Verwendung die Erhöhung des GMP-Synthetase Gehaltes in der Pflanze.

35

Dabei kann je nach Wahl des Promotors die Expression spezifisch in den Blättern, in den Samen oder anderen Teilen der Pflanze erfolgen. Solche transgenen Pflanzen, deren Vermehrungsgut sowie deren Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile sind ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung. 40

Die Erfindung wird durch die nun folgenden Beispiele erläutert, ist aber nicht auf diese beschränkt:

45

## Beispiele

Gentechnische Verfahren, die den Ausführungsbeispielen zugrunde liegen:

5

## Allgemeine Klonierungsverfahren

Klonierungsverfahren wie z.B. Restriktionsspaltungen, Agarose-Gelelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nucleinsäuren auf Nitrozellulose und Nylon Membranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von *Escherichia coli* Zellen, Anzucht von Bakterien und Sequenzanalyse rekombinanter DNA wurden wie bei Sambrook et al. (1989) (Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6) beschrieben durchgeführt.

15

## Sequenzanalyse rekombinanter DNA

Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgte mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma ABI nach der Methode von Sanger (Sanger et al. (1977), Proc. Natl. Acad. Sci. USA74, 5463-5467). Fragmente resultierend aus einer Polymerase Kettenreaktion wurden zur Vermeidung von Polymerasefehlern in zu exprimierenden Konstrukten sequenziert und überprüft.

25 Die verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders erwähnt, in p.a. Qualität von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) sowie Sigma (Deisenhofen) bezogen. Lösungen wurden mit aufbereitetem, pyrogenfreiem Wasser, im weiteren Text als H<sub>2</sub>O bezeichnet, aus einer Milli-Q

30 Water System Wasseraufbereitungsanlage (Millipore, Eschborn) angesetzt. Restriktionsendonucleasen, DNA-modifizierende Enzyme und molekularbiologische Kits wurden von den Firmen AGS (Heidelberg), Amersham (Braunschweig), Biometra (Göttingen), Roche (Mannheim), Genomed (Bad Oeynhausen), New England Biolabs (Schwalbach/Taunus), Novagen (Madison, Wisconsin, USA), Perkin-Elmer (Weiterstadt), Pharmacia (Freiburg) Qiagen (Hilden) und Stratagene (Heidelberg) bezogen. Sie wurden, soweit nicht anders erwähnt, nach Herstellerangaben verwendet.

40 Die im folgenden verwendeten Bakterienstämme (*E. coli*, XL-1 Blue) wurden von Stratagene bezogen. *E. coli* AT 2465 wurde bei dem *coli* genetic stock centre (Yale University, New Haven) bezogen. Der zur Pflanzentransformation verwendete Agrobakterienstamm (*Agrobacterium tumefaciens*, C58C1 mit dem Plasmid pGV2260 oder pGV3850kan) wurde von Deblaere et al. beschrieben (Nucl. Acids Res. 13 (1985) 4777). Alternativ können auch der Agrobakterienstamm LBA4404 (Clontech) oder andere geeignete Stämme eingesetzt

15

werden. Zur Klonierung können die Vektoren pUC19 (Yanish-Perron, Gene 33(1985), 103-119) pBluescript SK- (Stratagene), pGEM-T (Promega), pZero (Invitrogen), pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12(1984) 8711-8720) und pBinAR (Höfgen und Willmitzer, Plant 5 Science 66 (1990) 221-230) benutzt werden.

### Beispiel 1

Isolierung einer cDNA des guaA Gens, codierend für eine GMP-10 Synthetase aus Tabak.

Ein "expressed sequence tag" (EST) aus *Arabidopsis thaliana* (EST F14426), der auf einem partiellen Leseraster ein Polypeptid von 68 Aminosäuren mit 60 % Ähnlichkeit zu einer GMP-Synthetase aus 15 *Helicobacter pylori* codiert, wurde 5'-terminal ansequenziert. Von den 5'- und 3'-terminalen Sequenzen wurden die Oligonukleotide 5'-aag gat cca agc tct aag acc cta tcc-3' und 5'-tta gat ctt tat tcc cat tcg atg g-3' und für die Amplifikation durch Polymerase Kettenreaktion (PCR) eines 1000 bp cDNA-Fragments mit EST F14426 20 als Matrize in einem DNA-Thermal Cycler der Firma Perkin Elmer verwendet. Die Reaktionsgemische enthielten 0,1 ng/µl cDNA aus Tabak, 0,5 µM der entsprechenden Oligonukleotide, 200 µM Nukleotide (Pharmacia), 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3 bei 25°C, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>) und 0.02 U/µl Taq Polymerase (Perkin Elmer). 25

25

Die Amplifikationsbedingungen wurden wie folgt eingestellt:

Anlagerungstemperatur:	52 °C, 1 min
Denaturierungstemperatur:	92 °C, 1 min
30 Elongationstemperatur:	72 °C, 1,5 min
Anzahl der Zyklen:	30

Das Fragment wurde zur Durchmusterung einer cDNA-Bibliothek aus Kallusgewebe von *Nicotiana tabacum* (Varietät Samsun NN) im Vektor 35 ZAP Express eingesetzt. Dazu wurden  $2,5 \times 10^5$  Lambda Phagen der cDNA-Bibliothek auf Agarplatten mit *E. coli* XL1-Blue als Bakterienstamm ausplattiert. Die Phagen-DNA wurde mittels Standardverfahren (Sambrook et al. (1989); Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6) auf Nitrocellulosefilter (Gelman 40 Sciences) überführt und auf den Filtern fixiert. Als Hybridisierungssonde diente das oben beschriebene PCR-Fragment, das mit Hilfe eines "Multiprime DNA labelling systems" (Amersham Buchler) in Anwesenheit von  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP (spezifische Aktivität 3000 Ci/mmol) nach Herstellerangaben radioaktiv markiert wurde. Die Hybridisierung 45 der Membranen erfolgte nach Prähybridisierung bei 60 °C in 3 x SSPE, 0,1 % Natriumdodecylsulfat (w/v), 0,02 % Polyvinylpyrrolidon (w/v), 0,02 % Ficoll 400 (w/v) und 50 mg/ml Kalbsthymus DNA

## 16

für 12-16 Stunden (Sambrook et al. (1989); Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6). Anschließend wurden die Filter 60 Minuten in 2 x SSPE, 0,1 % Natriumdodecylsulfat (w/v) bei 60 °C gewaschen. Positiv hybridisierende Phagen wurden durch Auto-  
5 radiographie sichtbar gemacht und durch Standardtechniken gerei-  
nigt und vereinzelt.

Es konnten 13 hybridisierende Signale identifiziert und gereinigt werden. Nach Restriktionsanalyse wurden die Klone GMP-6 und  
10 GMP-7M zur doppelsträngigen Sequenzierung ausgewählt. Die Auswer-  
tung der Sequenzdaten zeigte, daß der Klon GMP-7M mit einer Länge von 1973 bp einen vollständigen Leserahmen von 1614 bp enthielt,  
der für ein Protein von 538 Aminosäuren mit einem errechneten Mo-  
lekulargewicht von 60,1 KDa kodiert (SEQ-ID No. 1). Vor dem anzu-  
15 nehmenden Start-Codon findet sich im gleichen Leserahmen ein Stop-Codon, was den Schluß zuläßt, daß es sich mit GMP-7M um eine cDNA voller Länge handelt. GMP-7M stellt somit die erste pflanz-  
liche Vollängen-cDNA einer GMP-Synthetase dar. GMP-6 stellt einen partiellen Klon dar, der 5'-seitig um 217 Nukleotide gegenüber  
20 GMP-7M verkürzt ist. GMP-7M weist Ähnlichkeiten zu GMP-Synthetasen aus Mikroorganismen und Tieren auf. Neben der auf EST F14426 codierten partiellen Aminosäuresequenz finden sich keine weiteren Sequenzen aus Pflanzen mit Homologie zu GMP-Synthetasen in den Datenbanken. Die größte Ähnlichkeit (62 %) besteht zu einer GMP-  
25 Synthetase aus *Helibacter pylori*. Es fällt zudem auf, daß die Ähnlichkeiten zwischen den C-Termini der GMP-Synthetasen größer sind als jene im Bereich der N-Termini. Der N-Terminus der GMP-7M Aminosäuresequenz korrespondiert mit den N-termini von GMP-Syn-  
thetasen aus anderen Organismen, wie *E. coli* und *Synechocystis*  
30 sp. (Tabelle 1). GMP-7M weist keine ausgeprägten Signalsequenzen auf (ermittelt durch Programm PSORT, Nakai, K., Institute for Mo-  
lecular and Cellular Biology, Osaka University, Japan) was auf eine cytosolische Lokalisation des Proteins hinweisen könnte.

## 35 Tabelle 1

Sequenzgegenüberstellung von GMP-Synthetasen aus *Nicotiana tabacum* (guA\_N.t = GMP-7M), *Arabidopsis thaliana* (guA\_est\_A.t, Genbank Nr. F14426), *E.coli* (guA\_e.c, Genbank Nr. 146276), *Syn-40 echocystis* sp. (guA\_syn, Genbank Nr. 1001583), *Helibacter pylori* (guA\_h.p, Genbank Nr. 3122166), *homo sapiens* (guA\_human, Genbank Nr. 1708072).

	1	50
	guA_N.t	-----MEPQ TQAKKSNLVL ILDYGSQYTH LITRRIRSLS
	guA_est_A.t	-----
	guA_e.c	-----m tenikhhril ildfgsqytq lvarrvreleg
	guA_syn	mttqipvppv vsdqalpdri sdrlkgqiv ildfgsqyse liarrirete
5	guA_h.p	-----mil vldfgsqytq liarrlreng
	guA_human	~malcngdsk lenaggdlkd ghhhriegavv ildagaqyqk vidrrvrelf
	51	100
	guA_N.t	IFSLTINGTS SLDSIKELDP RVIILSGGPH SVHADGAPCF PPGFIEYVES
	guA_est_A.t	-----
	guA_e.c	vcyelwawdv teaqirdfnp sgiilsggpe stteenspra pq....yvfe
10	guA_syn	vysevlsyrt taqqleikp kgiilsggpn svydgaapec dp....eifq
	guA_h.p	iyteivpffe sieniqkkap kglilsggpa svyakdaykp sg....kifd
	guA_human	vqseifplet pafaikeqgf raiiisggpn svyaedapwf dpa....ift
	101	150
	guA_N.t	RGIHVLGICY GLQLIVQKLG GVVKIGEKHE YGRMEIEVGK NVV....GGL
15	guA_est_A.t	-----
	guA_e.c	agpvfvqvcy gmqtamqqlg ghveasnere fgyaqvevvn dsalvrgied
	guA_syn	lgvpvlqvcy gmqlmvkqlg grverakrge ygkashhidd ptdlltnven
	guA_h.p	lnvpilgicy gmqylvdffg gvvvganeqe fgkavleitq nsvifegv..
	guA_human	igkpvlqvcy gmqmmnkvfg gtvhkksvre dgfnisvdn tcsifrglqk
	151	200
20	guA_N.t	FGNTEIGDKQ VVWMMSHGDEA VKLPEGFEVV ARSSQGAVAA IENRERRFYG
	guA_est_A.t	-----
	guA_e.c	altadgkpl1 dvwmshgdkv taipsdfitv astescpfai maneekrfyg
	guA_syn	dst..... .mwmshgdsc vdltgfefi ahtdntpcaa iadhqkalfg
	guA_h.p	.....kiks lvwmshmdkv ielpkgftt1 akspnspnphca iengk..ifg
	guA_human	.....ee vvl1thgdsv dkvadgfkvv arsgni.vag ianeskklyg
25	201	250
	guA_N.t	LQYHPEVTHS TEGMRTLHDF LFDVCGVTAG WKMEDVLEEE IKVIKGMVGP
	guA_est_A.t	-----
	guA_e.c	vqfhpevtht rqgmrmlerf vrdicqceal wtpakiidda varireqvg.
	guA_syn	vqfhpevvhs vggialirnf vyhichcept wttaafiees irevrsqvg.
30	guA_h.p	lqfhpevvqs eeggkilenf allvcgcekt wgmqhfaqre iarlkekia.
	guA_human	aqfhpevglt engkvilknf lydiagcsgt ftvqnrelec ireikervgt
	251	300
	guA_N.t	EDHVICALSG GVDSTVAAKL VHKAIG.DRL HCVFVDNGLL RYKERERVME
	guA_est_A.t	-----
	guA_e.c	ddkvilglsg gvdssvtaml lhraig.knl tcvfvdngll rlneaeqvld
35	guA_syn	drvrlallsg gvdssvtaml lhraig.dnl tcmfidqgfm rkgeperlve
	guA_h.p	nakvlcavsg gvdstvvatl lhraig.dnl iavfvdhgll rknekerqva
	guA_human	s.kvlvllsg gvdstvctal lnralnqeqv iavhidngfm rkresqsvee
	301	350
	guA_N.t	LFEK..... RLHLPVT CVDATEEFLS KLKGVTPEPEM
40	guA_est_A.t	-----
	guA_e.c	mfgd..... hfglniv hpaedrfpls alagendpea
	guA_syn	1fdh..... qfhipvq yvnardrflik qlegvtdpee
	guA_h.p	mfkd..... 1kipln tidaevefls klkgvsepel
	guA_human	alkk1giqvk vinaahsfyn gtttlpisde drtpkrisk tlnmttspee
	351	400
45	guA_N.t	KRKIIIGKEFI NIFDLFAHDV EEKVGKKPSY LVQGTLYPDV IESC...PPP
	guA_est_A.t	-----
	guA_e.c	krkiigrvfv evfd..eeal k...ledvkw laqgtiypdv iesaas....
	guA_syn	krrlighefi qvfe..eesn r...lgpfdy laqgtiypdv iesadsnvdp

## 18

guaA_h.p	krkiigetfi evfe..keak khhlgkief laggtlypdv iesvsv...	
guaA_human	krkiigdtfv ki..anevig emnlkpeevf laqgtrpd1 iesasl...	
	401	450
5 guaA_N.t	GSGRTHSHTI KSHHNVGGLP KDMKL..KLI EPLKLLFKDE VRELGKILDI	
guaA_est_A.t	~~~~~	~~~~~
guaA_e.c	atgk..ahvi kshhnvgglp kemkm..glv eplkelfkde vrkiglelg1	
guaA_syn	ktgervavki kshhnvgglp knlrf..klv eplrk1fkde vrklgrsigl	
guaA_h.p	...kgpskvi kthhnvgglp ewmdf..kli eplrelfkde vrllgkelgv	
guaA_human	.vasgkaeli kthhndteli rklreegkvi eplkdfhkde vrilgrelgl	
	451	500
10 guaA_N.t	SEDFLKRRHPF PGPGLAVRIP GDVTAGNSLD ILRQVDEIFI QSIRDAKIYD	
guaA_est_A.t	~~~~~	~~~~~
guaA_e.c	pydmllyrhpf ppgp1gvrl gevkk.eycd llrradaifi eelrkadlyd	
guaA_syn	peeivrrhpf ppgplairii gevts.erln ilrdadfvir deiskrgiyh	
guaA_h.p	sqdf1mrhpf ppgplavril geise.skik rlqeadfifi eelkkanlyd	
guaA_human	peelvsvrhpf ppgplairvi c.aeepyick dfpetnnilk ivadfsasvk	
	501	550
15 guaA_N.t	EIWQAFAVFL PVKTVGVQGD ORTHSHAVAL RA.VTSQDGM TADWYYFDFK	
guaA_est_A.t	~~~~~aqqd kgtiphvgcp pcrlqaqvgl tadwfifehk	
guaA_e.c	kvsqaftvfl pvrsvgvmdg grkydwvvs1 ra.vetidfm tahwahlyd	
guaA_syn	dywqafav11 pirsvgvmdg krtayahpv1 rf.itsedgm tadwarvpyd	
guaA_h.p	kvwqafcv11 nvnsvgvmdg nrtynaic1 ra.vnasdgm tasfsflehs	
20 guaA_human	kphtllqrhk acteedqek lmqitslhs1 nafl1piktv gvqgdcrsys	
	551	600
guaA_N.t	FLDDVSRKIC NSVRGVNRVL LDITSKPPST IEWE~~~~~	
guaA_est_A.t	flddvsrkic nsvqgvnrvv lditskppst iewe~~~~~	
guaA_e.c	flgrvsnrii nevngisrvv ydisgkppat iewe~~~~~	
25 guaA_syn	ileaisnrii nevkgvnrvv yditskppgt iewe~~~~~	
guaA_h.p	flekvsnrit nevsginrvv yditskppgt iewe~~~~~	
guaA_human	yvcgisskde pdwesifla rliprmchnv nrvvyyifgpp vkepptdvtp	
	601	650
30 guaA_N.t	~~~~~	~~~~~
guaA_est_A.t	~~~~~	~~~~~
guaA_e.c	~~~~~	~~~~~
guaA_syn	~~~~~	~~~~~
guaA_h.p	~~~~~	~~~~~
guaA_human	tflttgv1st lrqadfeahn ilresgyagk isqmpv1ltp lhfdrdplqk	
	651	700
35 guaA_N.t	~~~~~	~~~~~
guaA_est_A.t	~~~~~	~~~~~
guaA_e.c	~~~~~	~~~~~
guaA_syn	~~~~~	~~~~~
guaA_h.p	~~~~~	~~~~~
guaA_human	qpscqrsvvi rtfitsdfmt gipatpgnei pvevv1kmvt eikkipg1sr	
	701	716
40 guaA_N.t	~~~~~	~~~~~
guaA_est_A.t	~~~~~	~~~~~
guaA_e.c	~~~~~	~~~~~
guaA_syn	~~~~~	~~~~~
guaA_h.p	~~~~~	~~~~~
45 guaA_human	imydltskpp gtewe	

## Beispiel 2

Isolierung einer cDNA des guaA Gens, codierend für eine GMP-Synthetase aus dem Moos *Physcomitrella patens*

5

Aus mRNA verschieden alter Protonemata von *Physcomitrella patens* wurde doppelsträngige cDNA erzeugt und zur Herstellung einer cDNA-Bank im Vektor pBluescript SKII verwendet (lambda ZAP II RI Library construction Kit, Stratagene). Einzelne Klone dieser Bank 10 wurden ansequenziert. Die Sequenz des Klons 093-d11 wies deutliche Homologie zur GMP-Synthetase aus *Aquifex aeolicus* auf. Die vollständige Sequenz von 093-d11 wurde bestimmt, siehe SEQ-ID No. 3. 093\_d11 weist eine Länge von 1232 Nukleotiden auf und codiert auf einem durchgehenden Leseraster für 382 Aminosäuren. Aus dem 15 Vergleich mit GMP-7M geht hervor, daß es sich bei 093\_d11 um eine partielle cDNA handelt. Die Homologie zu GMP-7M beträgt 66,7 % auf Nucleotidebene bzw. 74,6 % auf Aminosäureebene.

## Beispiel 3

20

Funktionsnachweis für GMP-7M durch Komplementation von *E. coli*

Die GMP-7M cDNA wurde als Matrize für eine PCR mit den Oligonukleotiden 5'-CCTAGCCATGGAACCTCAAAC-3' und 5'-TATAGGATCCTACTTGG-25 GTCACC-3' eingesetzt. Die Reaktionsgemische enthielten ca. 0,1 ng GMP-7M DNA, 0,5 µM der entsprechenden Oligonukleotide, 200 µM Nukleotide (Pharmacia), 50 mM KC1, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3 bei 25 °C, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>) und 0.02 U/µl Pfu-Polymerase (Stratagene).

30 Die Amplifikationsbedingungen wurden wie folgt eingestellt:

Anlagerungstemperatur:	50 °C, 30 sec
Denaturierungstemperatur:	92 °C, 30 sec
Elongationstemperatur:	72 °C, 3 min
35 Anzahl der Zyklen:	25

Das erhaltene Fragment von ca. 1670 bp wurde über die durch die Oligonukleotide eingefügten NcoI- und BamHI-Schnittstellen in den Vektor pTrc99A (Pharmacia) ligiert. Das erhaltene Konstrukt 40 GMP-7Trc wurde in den *E. coli* Stamm AT2465 (genetische Marker: thi-1, guaA21, relA1, λ, spot1) transformiert und auf M9-Minimalmedien (Sambrook et al. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6) mit und ohne 100 µg/ml Guanosin platziert. Die Minimalmedien enthielten 0,4 % Glucose, 0,2% Casaminoacids, 100 µg/ml Thiamin, 100 µg/ml Inosin, 100 µg/ml Biotin, 100 µg/ml Histidin, 100 µg/ml Arginin, 100 µg/ml 2'-Deoxyuridin, 100 µM IPTG und 25 µg/ml Ampicillin. Im Parallelexperiment wurde

20

der Klonierungsvector pTrc99A in AT2465 transformiert. Es zeigte sich, daß nur die transformierten Bakterien zu einem Wachstum auf Minimalmedien ohne Guanosin fähig waren, die eine GMP-7M cDNA aus Tabak im Expressionsvektor pTrc 99 enthielten (siehe Tab. 2), was 5 stark darauf hinweist, daß die GMP-7M cDNA für eine aktive GMP-Synthetase codiert. Das durch GMP-7M codierte Enzym stellt damit die erste aus Pflanzen isolierte funktionelle GMP-Synthetase dar.

Tabelle 2

10

Wachstum von E. coli AT2465 transformiert mit verschiedenen Plasmiden nach 2 Tagen bei 37°C

15

	pTrc 99A + GMP-7M	pTrc99A
Minimalmedium ohne Guanosin	+	-
Minimalmedium mit Guanosin (100 µg/ml)	+	+

20

Beispiel 4

Überexpression der GMP-Synthetase aus Tabak in E.coli und Erzeugung von Antikörpern

25

Zur Überexpression in E.coli wurden durch (PCR) mit GMP-7M als Matrize und den Oligonukleotiden GMPA: 5'-GCAATGGATCCTCAAACA-CAGGCG-3' und GMPB: 5'-AAAAGGATCCTACTTGGTCACC-3' BamHI-Schnittstellen eingeführt, über welche das Fragment in den Vector pET15b 30 (Novagen) kloniert werden konnte. Auf diese Weise wurde ein GMP-7M-Leseraster mit Hexahistidin-Anker am N-Terminus erzeugt. Nach Kontrolle der korrekten Orientierung durch Restriktionsverdau und Ausschluß von Polymerasefehlern durch Sequenzierung, wurde das erhaltene Konstrukt GMP-7E in E. coli BL21(DE3) (Stratagene) transformiert. IPTG-induzierte Tageskulturen wurden durch Zentrifugation geerntet und die Zellpellets nach Herstellerangaben zur Nickel-Affinitätschromatographie aufgeschlossen und weiterbehandelt ("Qia-Express-Kit", Qiagen). Auf diese Weise konnte die GMP-Synthetase auf mehr als 95 % Reinheit aufgereinigt 35 werden. Das Protein wurde nach üblichen Protokollen zur Erzeugung von Antiseren in Kaninchen verwendet (im Auftrag durchgeführt durch die Firma Eurogentec, Herstal, Belgien).

45

## Beispiel 5

Expression der GMP-Synthetase aus Tabak in Baculovirus-infizierten Insektenzellen

5

Um genügend aktive GMP-Synthetase für die Massentestung von Chemikalien zu erhalten, wurde aus GMP-7E mit BamHI ein 1,65 kb Fragment excisiert und in den Transfervector pFastBacHTa (GibcoBRL) kloniert. Das erhaltene Konstrukt GMP-7I wurde nach

10 Herstellerangaben (GibcoBRL) zur Erzeugung von rekombinantem Baculovirus verwendet. Dieses Virus wurde nach Herstellerangaben (GibcoBRL) zur Infektion von Sf21 Insektenzellen genutzt, um aktive GMP-Synthetase zu erzeugen, deren Aktivität nach Aufschluß der Zellen in 50 mM Tris-HCl, pH 7,6, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 10 mM 15 PMSF und Entsalzung des Extraktes über eine Sephadex G-25-Säule (Pharmacia, Schweden) gemessen werden konnte.

## Beispiel 6

## 20 Erzeugung pflanzlicher Expressionskassetten

Mit dem Ziel die GMP-Synthetase-Aktivität in transgenen Tabakpflanzen zu reduzieren, wurde die Antisense- und die Cosuppressionstechnik angewendet. Dazu wurden Plasmid-Konstrukte im Vektor 25 pBinAR (Höfgen und Willmitzer, Plant Science (1990) 66, 221-230) erzeugt. Ein mit BamHI und BgIII aus GMP-7M erhaltenes Fragment von 1599 bp wurde in den mit BamHI geschnittenen Vector pBinAR ligiert. Das 1599 bp Fragment codiert den 5'-terminalen Teil der GMP-Synthetase cDNA. Nach Transformation in E.coli XL1-blue 30 erhaltene Klone wurden durch Kontrollschnitt mit HindIII auf die Orientierung der 1599-Kassette untersucht. Auf diese Weise wurden die Plasmide pGMP7AS (antisense-Konstrukt) und pGMP7EX (sense-Konstrukt) identifiziert, siehe Abbildung 2.

## 35 Beispiel 7

## Erzeugung und Analyse transgener Pflanzen

Die Plasmide pGMP7AS und pGMP7EX - siehe Abbildung 2 - wurden in 40 Agrobacterium tumefaciens C58C1:pGV2260 transformiert (Deblaere et al., Nucl. Acids. Res. 13 (1984), 4777-4788). Zur Transformation von Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN) wurde eine 1:50 Verdünnung einer Übernachtkultur einer positiv transformierten Agrobakterienkolonie in Murashige-Skoog Medium (Physiol. Plant. 15 (1962), 473) mit 2 % Saccharose (2MS-Medium) benutzt. Blattscheiben steriler Pflanzen (zu je ca. 1 cm<sup>2</sup>) wurden in einer Petrischale mit einer 1:50 Agrobakterienverdünnung für 5-10

## 22

Minuten inkubiert. Es folgte eine 2-tägige Inkubation in Dunkelheit bei 25 °C auf 2MS-Medium mit 0,8 % Bacto-Agar. Die Kultivierung wurde nach 2 Tagen mit 16 Stunden Licht/8 Stunden Dunkelheit weitergeführt und in wöchentlichem Rhythmus auf MS-Medium mit 500 mg/1 Claforan (Cefotaxime-Natrium), 50 mg/1 Kanamycin, 1 mg/1 Benzylaminopurin (BAP), 0,2 mg/1 Naphtylessigsäure und 1,6 g/1 Glukose weitergeführt. Wachsende Sprosse wurden auf MS-Medium mit 2 % Saccharose, 250 mg/1 Claforan und 0,8 % Bacto-Agar überführt. Regenerierte Sprosse werden auf 2MS-Medium mit Kanamycin und Cla-  
foran erhalten, nach Bewurzelung in Erde überführt und nach Kultivierung für zwei Wochen in einer Klimakammer im 16 Stunden hell/8 Stunden dunkel-Rhythmus bei 60 % Luftfeuchte auf Fremdgenexpression bzw. veränderte Metabolitgehalte und phänotypische Wachstumsmerkmale untersucht. Veränderte Nukleotidgehalte können z.B. nach der Methode von Stitt et al. (FEBS Letters, 145 (1982), 217-222) bestimmt werden.

Die transgenen Linien sowie die Nachkommen der 1. und 2. Generation wiesen ein verringertes Wachstum in Erde auf. In Pflanzen mit verringertem Wachstum konnte eine im Vergleich zum Wildtyp reduzierte GMP-7M RNA-Menge in der Northern-Hybridisierung detektiert werden. Dazu wurden je 40 µg Gesamt-RNA aus Sink-Blättern eingesetzt. Gesamt-RNA aus pflanzlichen Geweben wurde wie bei Logemann et al. (Anal. Biochem. 163 (1987), 21) isoliert. Für die Analyse wurden jeweils 40 µg RNA in einem Formaldehydhaltigen 1,5 %igen Agarosegel aufgetrennt und auf Nylon Membranen (Hybond, Amersham) überführt. Der Nachweis spezifischer Transkripte wurde wie bei Amasino beschrieben durchgeführt (Anal. Biochem. 152 (1986), 304). Die als Sonde eingesetzten cDNA-Fragmente wurden mit einem Random Primed DNA Labeling Kit (Roche, Mannheim) radioaktiv markiert und nach Standardmethoden hybridisiert, siehe Hybond-Benutzerhinweise, Amersham. Hybridisierungssignale wurden durch Autoradiographie mithilfe von X-OMAT AR Filmen der Fa. Kodak sichtbar gemacht.

35

Ferner konnte im Western-blot Experiment eine im Vergleich mit Wildtyppflanzen verringerte Menge der GMP-Synthetase in den transgenen Linien detektiert werden. Dazu wurden Gesamtproteinextrakte aus Sink-Blättern hergestellt, nach Standardmethoden in SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese separiert und auf Nitrocellulose-Membranen transferiert. Die Detektion erfolgte mit einem IgG-alkalische Phosphatase-Konjugat und dem BCIP/NBT-System (Sigma).

45

23

Desweiteren konnte durch den in Beispiel 8 beschriebenen in vitro Assay eine verringerte GMP-Synthetase-Aktivität in transgenen Linien mit verringertem Wachstum festgestellt werden.

5 Der korellative Zusammenhang zwischen Expressionsniveau sowie der Aktivität der GMP-Synthetase und dem Wachstumsphänotyp lässt auf die Eignung der GMP-Synthetase als Target für Herbizide schließen.

10 Veränderung der Nukleotidgehalte Veränderung des Methylxanthin-Gehalts

Beispiel 8

15 Testsysteme zur Messung der GMP-Synthetase-Aktivität

Zur Messung der pflanzlichen GMP-Synthetase-Aktivität können die nach Spector (Methods in Enzymology LI, 1978, 219-224) für tierische Enzyme entwickelten Systeme verwendet werden. Im ersten System wird die AMP-Bildung durch Kopplung der Reaktion mit AMP-Kinase, Pyruvat Kinase, Lactat-Dehydrogenase und Messung bei 340 nm ermöglicht. Das zweite System basiert auf dem direkten Nachweis des GMP (Guanosinmonophosphat) durch Einsatz des radioaktiv markierten Substrats XMP (Xanthinmonophosphat) und Auftrennung in 25 der Dünnschichtchromatographie.

Alternativ kann die GMP-Synthetase-Aktivität auch über ein neues System, nämlich den gekoppelten Nachweis des entstehenden Glutamats gemessen werden. Dieses System bietet den Vorteil einer geringeren Anzahl gekoppelter Reaktionsschritte und liefert größere Signalstärken.



35



(GMP-S = GMP-Synthetase, GluDH = Glutamat-Dehydrogenase, APAD = 40 3-Acetylpyridin-Adenin-Dinucleotid)

Dazu wurde der Reaktionsansatz (s.u.) für 60 Minuten bei 37°C inkubiert und die Reaktion durch 5-minütige Inkubation bei 95°C gestoppt. Der Nachweis des gebildeten Glutamats erfolgte im Nachweisansatz (s.u.) durch photometrische Messung der APADH-Zunahme bei 363 nm.

24

## Reaktionsansatz:

100 $\mu$ L	750 mM	Tris/HCl-Puffer pH 7,8
100 $\mu$ L	100 mM	MgCl <sub>2</sub>
5 100 $\mu$ L	80 mM	KCl
100 $\mu$ L	20 mM	XMP
100 $\mu$ L	200 mM	L-Glutamin
400 $\mu$ L		H <sub>2</sub> O
<u>100 <math>\mu</math>L</u>		Proteinextrakt
10 1000 $\mu$ L		

## Nachweisansatz:

375 $\mu$ L	100 mM	Tris-HCl-Ruffer pH 8.0
15 75 $\mu$ L	500 mM	KCl
125 $\mu$ L		H <sub>2</sub> O
75 $\mu$ L	3 mM	APAD
<u>100 <math>\mu</math>L</u>		des Reaktionsansatzes
750 $\mu$ L		

20

## Beispiel 9

## Suche nach Inhibitoren der GMP-Synthetase Aktivität

25 zur Suche nach Inhibitoren der GMP-Synthetase Aktivität kann der in Beispiel 8 beschriebene *in vitro* Assay mit Hochdurchsatzmethoden verwendet werden. Die GMP-Synthetase Aktivität kann dazu aus Pflanzengeweben präpariert werden. Bevorzugt kann eine pflanzliche GMP-Synthetase in *E.coli*, Insektenzellen oder einem anderen geeigneten Expressionssystem exprimiert und anschließend angereichert oder isoliert werden. Auf diese Weise konnten bekannte Inhibitoren, wie 6-thio-XMP identifiziert werden.

35

40

45

Abbildung 1

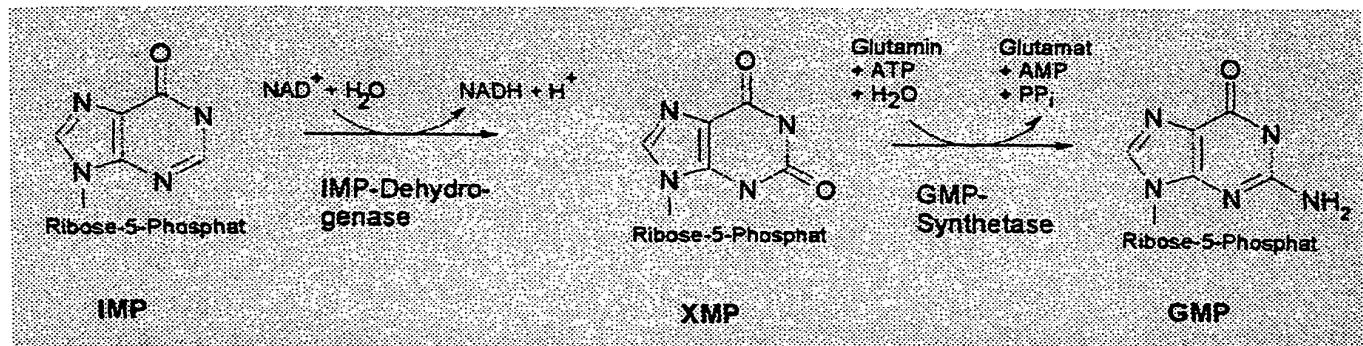
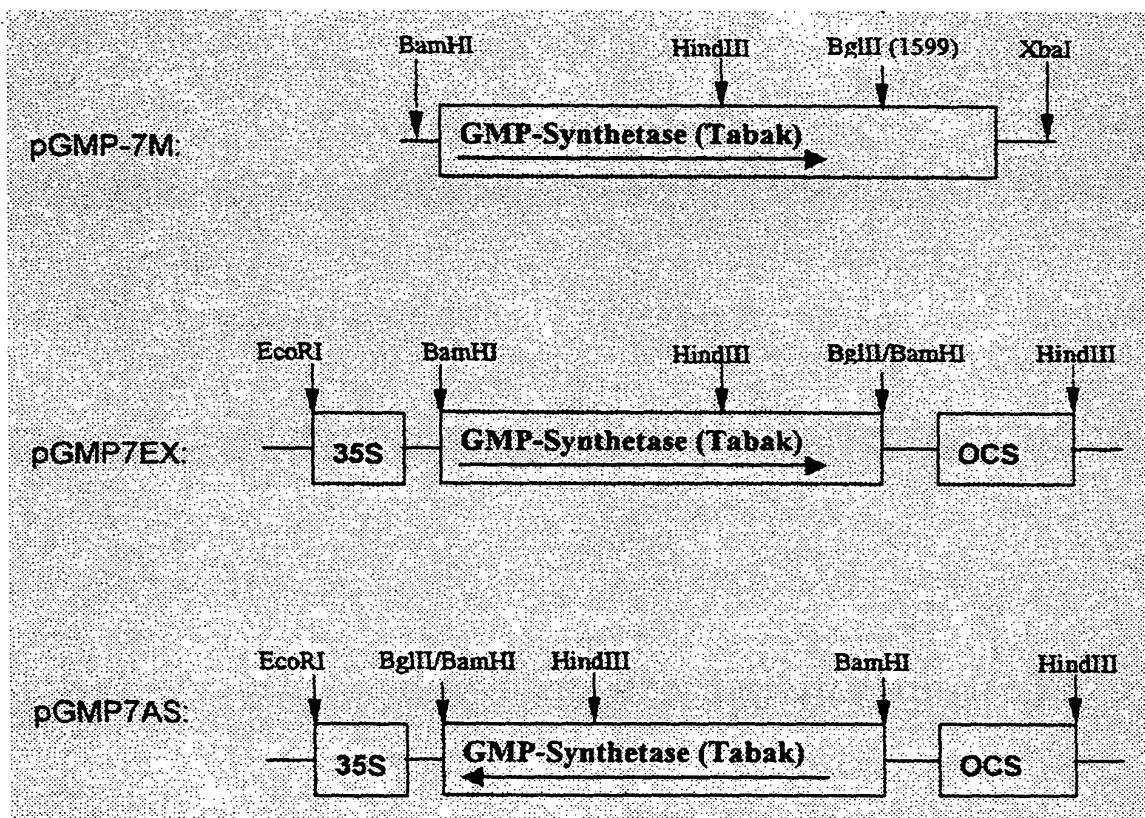


Abbildung 2



GMP-Synthetase

Zusammenfassung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft eine DNA codierend für ein Polypeptid mit GMP-Synthetase (EC 6.3.5.2) Aktivität. Zudem betrifft die Erfindung die Verwendung dieser Nukleinsäure zur Herstellung eines Testsystems.

10

15

20

25

30

35

40

45

SEQUENZPROTOKOLL

<110> BASF Aktiengesellschaft

<120> GMP-Synthetase aus Pflanzen

<130> NAE 1122-99

<140>

<141>

<160> 4

<170> PatentIn Vers. 2.0

<210> 1

<211> 1973

<212> DNA

<213> Nicotiana tabacum

<220>

<221> CDS

<222> (65) .. (1678)

<400> 1

gaattcggca cgagatttct ctctatcttt ctccctccca cccaccaccc accctccccct 60

agca atg gaa cct caa aca cag gcg aag aaa tca aac ctc gta cta atc 109  
Met Glu Pro Gln Thr Gln Ala Lys Lys Ser Asn Leu Val Leu Ile  
1 5 10 15

cta gac tac ggt tct cag tac act cac cta atc acc cgc cga atc cga 157  
Leu Asp Tyr Gly Ser Gln Tyr Thr His Leu Ile Thr Arg Arg Ile Arg  
20 25 30

agc cta tca att ttc tca ctc acc att aac ggc acc tct tcg tta gac 205  
Ser Leu Ser Ile Phe Ser Leu Thr Ile Asn Gly Thr Ser Ser Leu Asp  
35 40 45

tcc ata aaa gaa ctc gac cca cgt gtc att atc ctc tcg ggt gga ccc 253  
Ser Ile Lys Glu Leu Asp Pro Arg Val Ile Ile Leu Ser Gly Gly Pro  
50 55 60

cac agc gtc cac gct gac ggc gca ccg tgt ttc cca cct ggg ttc atc 301  
His Ser Val His Ala Asp Gly Ala Pro Cys Phe Pro Pro Gly Phe Ile  
65 70 75

gaa tac gtc gag tca cgt ggg att cac gtg ttg ggt ata tgt tat ggg 349

Glu	Tyr	Val	Glu	Ser	Arg	Gly	Ile	His	Val	Leu	Gly	Ile	Cys	Tyr	Gly	
80			85				90					95				
ctg cag ttg att gtt cag aaa ctt ggc ggg gtt gtg aaa att gga gag															397	
Leu Gln Leu Ile Val Gln Lys Leu Gly Gly Val Val Lys Ile Gly Glu																
100			105				110									
aaa cat gag tat ggg aga atg gaa att gag gtt gga aag aat gtt gtt															445	
Lys His Glu Tyr Gly Arg Met Glu Ile Glu Val Gly Lys Asn Val Val																
115			120				125									
ggg ggg ttg ttt ggg aat acg gaa att ggt gat aaa cag gtg gtt tgg															493	
Gly Gly Leu Phe Gly Asn Thr Glu Ile Gly Asp Lys Gln Val Val Trp																
130			135				140									
atg agc cac ggt gat gag gct gtg aaa ttg ccg gaa ggg ttt gag gtt															541	
Met Ser His Glu Asp Glu Ala Val Lys Leu Pro Glu Gly Phe Glu Val																
145			150				155									
gtg gcg agg agt agt cag ggt gct gtt gct gct att gag aat cgg gaa															589	
Val Ala Arg Ser Ser Gln Gly Ala Val Ala Ala Ile Glu Asn Arg Glu																
160			165				170					175				
cgg agg ttt tat ggg ctg cag tat cat ccc gag gta acg cac tcg act															637	
Arg Arg Phe Tyr Gly Leu Gln Tyr His Pro Glu Val Thr His Ser Thr																
180			185				190									
gaa ggg atg aga aca tta aga cac ttt ctg ttt gat gta tgt ggc gtt															685	
Glu Gly Met Arg Thr Leu Arg His Phe Leu Phe Asp Val Cys Gly Val																
195			200				205									
aca gct ggc tgg aag atg gaa gat gtt ctg gag gaa gaa ata aaa gtt															733	
Thr Ala Gly Trp Lys Met Glu Asp Val Leu Glu Glu Ile Lys Val																
210			215				220									
atc aaa ggt atg gtt gga cct gaa gat cac gtg att tgt gct tta tct															781	
Ile Lys Gly Met Val Gly Pro Glu Asp His Val Ile Cys Ala Leu Ser																
225			230				235									
ggt ggt gtt gat tcc aca gtt gca gct aaa ttg gta cac aag gct atc															829	
Gly Gly Val Asp Ser Thr Val Ala Ala Lys Leu Val His Lys Ala Ile																
240			245				250					255				
ggg gac agg ctt cac tgt gtt ttt gtt gat aat ggt cta tta agg tat															877	
Gly Asp Arg Leu His Cys Val Phe Val Asp Asn Gly Leu Leu Arg Tyr																
260			265				270									
aag gag aga gaa agg gtg atg gaa ctc ttt gag aag cgc ctt cat ttg															925	

Lys	Glu	Arg	Glu	Arg	Val	Met	Glu	Leu	Phe	Glu	Lys	Arg	Leu	His	Leu	
					275			280						285		
cct gtt acc tgt gtc gat gct aca gaa gaa ttt ctc agc aaa cta aaa															973	
Pro	Val	Thr	Cys	Val	Asp	Ala	Thr	Glu	Glu	Phe	Leu	Ser	Lys	Leu	Lys	
					290			295				300				
ggc gta aca gaa cct gaa atg aag agg aaa ata att ggg aag gag ttc															1021	
Gly	Val	Thr	Glu	Pro	Glu	Met	Lys	Arg	Lys	Ile	Ile	Gly	Lys	Glu	Phe	
					305			310			315					
atc aac ata ttt gat ctt ttt gcc cat gat gtg gag gaa aaa gta ggg															1069	
Ile	Asn	Ile	Phe	Asp	Leu	Phe	Ala	His	Asp	Val	Glu	Glu	Lys	Val	Gly	
					320			325			330			335		
aaa aaa cct agt tac cta gtc caa gga acc ttg tat cct gat gta ata															1117	
Lys	Lys	Pro	Ser	Tyr	Leu	Val	Gln	Gly	Thr	Leu	Tyr	Pro	Asp	Val	Ile	
					340			345			350					
gag tct tgt cct cca cct gga agt gga aga aca cat tct cat aca atc															1165	
Glu	Ser	Cys	Pro	Pro	Gly	Ser	Gly	Arg	Thr	His	Ser	His	Thr	Ile		
					355			360			365					
aag agc cat cat aat gtt gga ggt ctt cca aag gac atg aag ctg aag															1213	
Lys	Ser	His	His	Asn	Val	Gly	Gly	Leu	Pro	Lys	Asp	Met	Lys	Leu	Lys	
					370			375			380					
ctc atc gag cca ctg aaa ctt cta ttc aag gat gag gtt cgt gaa ttg															1261	
Leu	Ile	Glu	Pro	Leu	Lys	Leu	Phe	Lys	Asp	Glu	Val	Arg	Glu	Leu		
					385			390			395					
gga aag att ttg gat ata tct gag gac ttt ctt aaa cgc cac ccg ttc															1309	
Gly	Lys	Ile	Leu	Asp	Ile	Ser	Glu	Asp	Phe	Leu	Lys	Arg	His	Pro	Phe	
					400			405			410			415		
cct ggg ccc gga ctc gct gtg cga att cca ggt gat gtc aca gca ggg															1357	
Pro	Gly	Pro	Gly	Leu	Ala	Val	Arg	Ile	Pro	Gly	Asp	Val	Thr	Ala	Gly	
					420			425			430					
aat tcc ttg gat att ctt cgt cag gtt gat gaa atc ttc att caa tca															1405	
Asn	Ser	Leu	Asp	Ile	Leu	Arg	Gln	Val	Asp	Glu	Ile	Phe	Ile	Gln	Ser	
					435			440			445					
atc aga gat gct aaa atc tat gat gaa ata tgg caa gct ttt gct gtc															1453	
Ile	Arg	Asp	Ala	Lys	Ile	Tyr	Asp	Glu	Ile	Trp	Gln	Ala	Phe	Ala	Val	
					450			455			460					
ttc tta cca gtg aaa act gtt gga gta caa gga gac caa aga acc cat															1501	

Phe Leu Pro Val Lys Thr Val Gln Gly Asp Gln Arg Thr His  
465 470 475

tcc cac gct gtt gca ctt aga gca gtc aca agt caa gat gga atg act 1549  
Ser His Ala Val Ala Leu Arg Ala Val Thr Ser Gln Asp Gly Met Thr  
480 485 490 495

gca gac tgg tac tac ttt gat ttc aag ttc ctt gac gac gta tca aga 1597  
Ala Asp Trp Tyr Tyr Phe Asp Phe Lys Phe Leu Asp Asp Val Ser Arg  
500 505 510

aag atc tgc aat agt gtt cgt ggt gta aat cga gtt ctg ctg gat att 1645  
Lys Ile Cys Asn Ser Val Arg Gly Val Asn Arg Val Leu Leu Asp Ile  
515 520 525

aca tca aag cct cca tca aca atc gaa tgg gaa taatttgtta taaagaatgc 1698  
Thr Ser Lys Pro Pro Ser Thr Ile Glu Trp Glu  
530 535

tatatttgtt gaccaaagta ggattctttt gtgatttttg gtgcataaca aaaaggaaga 1758

aaatcataat agaaattttag gtcctttgt tatgtggtag aactggttct tggtaatta 1818

tgtgcaatgc tctcaacaat tttgtatgtt tatgggtatg atgataccaa atttactca 1878

gatcttggta gtacatttt cttatccaag tatagttaaca tgtggccagg catcaaaagc 1938

ctattccact caaaaaaaaaa aaaaaaaaaac tcgag 1973

<210> 2  
<211> 538  
<212> PRT  
<213> Nicotiana tabacum

<400> 2  
Met Glu Pro Gln Thr Gln Ala Lys Lys Ser Asn Leu Val Leu Ile Leu  
1 5 10 15

Asp Tyr Gly Ser Gln Tyr Thr His Leu Ile Thr Arg Arg Ile Arg Ser  
20 25 30

Leu Ser Ile Phe Ser Leu Thr Ile Asn Gly Thr Ser Ser Leu Asp Ser  
35 40 45

Ile Lys Glu Leu Asp Pro Arg Val Ile Ile Leu Ser Gly Gly Pro His  
50 55 60

Ser Val His Ala Asp Gly Ala Pro Cys Phe Pro Pro Gly Phe Ile Glu  
65 70 75 80

Tyr Val Glu Ser Arg Gly Ile His Val Leu Gly Ile Cys Tyr Gly Leu  
85 90 95

Gln Leu Ile Val Gln Lys Leu Gly Gly Val Val Lys Ile Gly Glu Lys  
100 105 110

His Glu Tyr Gly Arg Met Glu Ile Glu Val Gly Lys Asn Val Val Gly  
115 120 125

Gly Leu Phe Gly Asn Thr Glu Ile Gly Asp Lys Gln Val Val Trp Met  
130 135 140

Ser His Gly Asp Glu Ala Val Lys Leu Pro Glu Gly Phe Glu Val Val  
145 150 155 160

Ala Arg Ser Ser Gln Gly Ala Val Ala Ala Ile Glu Asn Arg Glu Arg  
165 170 175

Arg Phe Tyr Gly Leu Gln Tyr His Pro Glu Val Thr His Ser Thr Glu  
180 185 190

Gly Met Arg Thr Leu Arg His Phe Leu Phe Asp Val Cys Gly Val Thr  
195 200 205

Ala Gly Trp Lys Met Glu Asp Val Leu Glu Glu Ile Lys Val Ile  
210 215 220

Lys Gly Met Val Gly Pro Glu Asp His Val Ile Cys Ala Leu Ser Gly  
225 230 235 240

Gly Val Asp Ser Thr Val Ala Ala Lys Leu Val His Lys Ala Ile Gly  
245 250 255

Asp Arg Leu His Cys Val Phe Val Asp Asn Gly Leu Leu Arg Tyr Lys  
260 265 270

Glu Arg Glu Arg Val Met Glu Leu Phe Glu Lys Arg Leu His Leu Pro  
275 280 285

Val Thr Cys Val Asp Ala Thr Glu Glu Phe Leu Ser Lys Leu Lys Gly  
290 295 300

Val Thr Glu Pro Glu Met Lys Arg Lys Ile Ile Gly Lys Glu Phe Ile  
305 310 315 320

Asn Ile Phe Asp Leu Phe Ala His Asp Val Glu Glu Lys Val Gly Lys  
325 330 335

Lys Pro Ser Tyr Leu Val Gln Gly Thr Leu Tyr Pro Asp Val Ile Glu  
340 345 350

Ser Cys Pro Pro Pro Gly Ser Gly Arg Thr His Ser His Thr Ile Lys  
355 360 365

Ser His His Asn Val Gly Gly Leu Pro Lys Asp Met Lys Leu Lys Leu  
370 375 380

Ile Glu Pro Leu Lys Leu Leu Phe Lys Asp Glu Val Arg Glu Leu Gly  
385 390 395 400

Lys Ile Leu Asp Ile Ser Glu Asp Phe Leu Lys Arg His Pro Phe Pro  
405 410 415

Gly Pro Gly Leu Ala Val Arg Ile Pro Gly Asp Val Thr Ala Gly Asn  
420 425 430

Ser Leu Asp Ile Leu Arg Gln Val Asp Glu Ile Phe Ile Gln Ser Ile  
435 440 445

Arg Asp Ala Lys Ile Tyr Asp Glu Ile Trp Gln Ala Phe Ala Val Phe  
450 455 460

Leu Pro Val Lys Thr Val Gly Val Gln Gly Asp Gln Arg Thr His Ser  
465 470 475 480

His Ala Val Ala Leu Arg Ala Val Thr Ser Gln Asp Gly Met Thr Ala  
485 490 495

Asp Trp Tyr Tyr Phe Asp Phe Lys Phe Leu Asp Asp Val Ser Arg Lys  
500 505 510

Ile Cys Asn Ser Val Arg Gly Val Asn Arg Val Leu Leu Asp Ile Thr  
515 520 525

Ser Lys Pro Pro Ser Thr Ile Glu Trp Glu  
530 535

<210> 3  
<211> 1232  
<212> DNA  
<213> *Physcomitrella patens*

<220>  
<221> CDS  
<222> (3)..(1148)

<400> 3

ga att cgg cac gag gcc act agt acg cag ggt aat att gcc gct att 47  
Ile Arg His Glu Ala Thr Ser Thr Gln Gly Asn Ile Ala Ala Ile  
1 5 10 15

gaa aat gtg gat tcc aga atc tac gcc ctc caa tac cat ccc gag gtt 95  
Glu Asn Val Asp Ser Arg Ile Tyr Ala Leu Gln Tyr His Pro Glu Val  
20 25 30

acg cac tca gag aaa ggg aca gag act ttg aga cac ttt ttc ctg aat 143  
Thr His Ser Glu Lys Gly Thr Glu Thr Leu Arg His Phe Phe Leu Asn  
35 40 45

gtc tgc ggc atg aag gct gac tgg cag atg cag aat gtg ttg gag gaa 191  
Val Cys Gly Met Lys Ala Asp Trp Gln Met Gln Asn Val Leu Glu Glu  
50 55 60

gag att aaa aag gtc act gcg acc gtc ggc cca gat gat cat gat gtt att 239  
Glu Ile Lys Lys Val Thr Ala Thr Val Gly Pro Asp Asp His Val Ile  
65 70 75

tgt gca ctc tcc ggg ggc gtg gac tca aca gta gca gct act ctg gtg 287  
Cys Ala Leu Ser Gly Gly Val Asp Ser Thr Val Ala Ala Thr Leu Val  
80 85 90 95

cac cgt gct att gga gat cgc ctt cat tgt gtg ttt gta gat aat ggc 335  
His Arg Ala Ile Gly Asp Arg Leu His Cys Val Phe Val Asp Asn Gly  
100 105 110

ctt tgc aga tac aag gaa aga gaa gaa gta atg gcc aca ttt gtg aaa 383  
Leu Cys Arg Tyr Lys Glu Arg Glu Arg Val Met Ala Thr Phe Val Lys  
115 120 125

gac ctt cat ctg cca gtc act tgt gtg gat gcc act gag cag ttt ctc 431  
Asp Leu His Leu Pro Val Thr Cys Val Asp Ala Thr Glu Gln Phe Leu  
130 135 140

agc aaa ttg aag ggc gtg gta gat cca gag aga aag agg aag atc atc 479  
Ser Lys Leu Lys Gly Val Val Asp Pro Glu Arg Lys Arg Lys Ile Ile  
145 150 155

gga gca gag ttt att gca gtc ttt gat gaa ttt tcg cac aga ttg gag 527  
Gly Ala Glu Phe Ile Ala Val Phe Asp Glu Phe Ser His Arg Leu Glu  
160 165 170 175

aga gag att gga aag atg cct gct ttc ctt gtg cag gga aca ctt tat	575		
Arg Glu Ile Gly Lys Met Pro Ala Phe Leu Val Gln Gly Thr Leu Tyr			
180	185	190	
cca gat gtc att gag tcg tgt cct cct cca ggg agc ggg aag tcg cat	623		
Pro Asp Val Ile Glu Ser Cys Pro Pro Gly Ser Gly Lys Ser His			
195	200	205	
tcc cac aca atc aaa agt cat cac aac gtc ggt ggc ttg ccc gag aac	671		
Ser His Thr Ile Lys Ser His His Asn Val Gly Gly Leu Pro Glu Asn			
210	215	220	
atg aaa ttg aag ttg gag cct ctc aag tgg ctc ttc aaa gac gag	719		
Met Lys Leu Lys Leu Val Glu Pro Leu Lys Trp Leu Phe Lys Asp Glu			
225	230	235	
gta cgc gaa atg ggt gca ttg ttg gat gta cct gtt tcc ttt ttg aag	767		
Val Arg Glu Met Gly Ala Leu Leu Asp Val Pro Val Ser Phe Leu Lys			
240	245	250	255
cgc cat cct ttc cct gga cct gga ttg gcc gtc cga att ctt ggg gat	815		
Arg His Pro Phe Pro Gly Pro Gly Leu Ala Val Arg Ile Leu Gly Asp			
260	265	270	
gta act cag gac ggc gca ctc gac act atc cgc ttg gtt gat gag atc	863		
Val Thr Gln Asp Gly Ala Leu Asp Thr Ile Arg Leu Val Asp Glu Ile			
275	280	285	
ttt gtg aac agc att cga gag gca ggt ctt tac gat aag atc tgg cag	911		
Phe Val Asn Ser Ile Arg Glu Ala Gly Leu Tyr Asp Lys Ile Trp Gln			
290	295	300	
gca ttt gct gtt tat ctg cca gta aag act gtt ggc gtt caa ggc gac	959		
Ala Phe Ala Val Tyr Leu Pro Val Lys Thr Val Gly Val Gln Gly Asp			
305	310	315	
aaa cgg aca cat tca cac gct gtt cta cgt gca att aca agt gaa	1007		
Lys Arg Thr His Ser His Ala Val Ala Leu Arg Ala Ile Thr Ser Glu			
320	325	330	335
gac gga atg act gct gac tgg ttt cat ttt gat gga aag ttt ctt gcc	1055		
Asp Gly Met Thr Ala Asp Trp Phe His Phe Asp Gly Lys Phe Leu Ala			
340	345	350	
gag gta tca tct aaa atc tgc aac agc gta agg ggt atc aat agg gtg	1103		
Glu Val Ser Ser Lys Ile Cys Asn Ser Val Arg Gly Ile Asn Arg Val			
355	360	365	

gta tac gac att acg tct aaa cct cca tca act gtt gag tgg gaa 1148  
Val Tyr Asp Ile Thr Ser Lys Pro Pro Ser Thr Val Glu Trp Glu  
370 375 380

tagacgtcag taatgtattt tggaaagtact gttggttatg acgattcact gcaatactta 1208

acaaaactatt ttatacttca aaaa 1232

<210> 4

<211> 382

<212> PRT

<213> *Physcomitrella patens*

<400> 4

Ile Arg His Glu Ala Thr Ser Thr Gln Gly Asn Ile Ala Ala Ile Glu  
1 5 10 15

Asn Val Asp Ser Arg Ile Tyr Ala Leu Gln Tyr His Pro Glu Val Thr  
20 25 30

His Ser Glu Lys Gly Thr Glu Thr Leu Arg His Phe Phe Leu Asn Val  
35 40 45

Cys Gly Met Lys Ala Asp Trp Gln Met Gln Asn Val Leu Glu Glu  
50 55 60

Ile Lys Lys Val Thr Ala Thr Val Gly Pro Asp Asp His Val Ile Cys  
65 70 75 80

Ala Leu Ser Gly Gly Val Asp Ser Thr Val Ala Ala Thr Leu Val His  
85 90 95

Arg Ala Ile Gly Asp Arg Leu His Cys Val Phe Val Asp Asn Gly Leu  
100 105 110

Cys Arg Tyr Lys Glu Arg Glu Arg Val Met Ala Thr Phe Val Lys Asp  
115 120 125

Leu His Leu Pro Val Thr Cys Val Asp Ala Thr Glu Gln Phe Leu Ser  
130 135 140

Lys Leu Lys Gly Val Val Asp Pro Glu Arg Lys Arg Lys Ile Ile Gly  
145 150 155 160

Ala Glu Phe Ile Ala Val Phe Asp Glu Phe Ser His Arg Leu Glu Arg  
165 170 175

Glu Ile Gly Lys Met Pro Ala Phe Leu Val Gln Gly Thr Leu Tyr Pro  
180 185 190

Asp Val Ile Glu Ser Cys Pro Pro Pro Gly Ser Gly Lys Ser His Ser  
195 200 205

His Thr Ile Lys Ser His His Asn Val Gly Gly Leu Pro Glu Asn Met  
210 215 220

Lys Leu Lys Leu Val Glu Pro Leu Lys Trp Leu Phe Lys Asp Glu Val  
225 230 235 240

Arg Glu Met Gly Ala Leu Leu Asp Val Pro Val Ser Phe Leu Lys Arg  
245 250 255

His Pro Phe Pro Gly Pro Gly Leu Ala Val Arg Ile Leu Gly Asp Val  
260 265 270

Thr Gln Asp Gly Ala Leu Asp Thr Ile Arg Leu Val Asp Glu Ile Phe  
275 280 285

Val Asn Ser Ile Arg Glu Ala Gly Leu Tyr Asp Lys Ile Trp Gln Ala  
290 295 300

Phe Ala Val Tyr Leu Pro Val Lys Thr Val Gly Val Gln Gly Asp Lys  
305 310 315 320

Arg Thr His Ser His Ala Val Ala Leu Arg Ala Ile Thr Ser Glu Asp  
325 330 335

Gly Met Thr Ala Asp Trp Phe His Phe Asp Gly Lys Phe Leu Ala Glu  
340 345 350

Val Ser Ser Lys Ile Cys Asn Ser Val Arg Gly Ile Asn Arg Val Val  
355 360 365

Tyr Asp Ile Thr Ser Lys Pro Pro Ser Thr Val Glu Trp Glu  
370 375 380

